

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 avril 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/027086 A1

(51) Classification Internationale des brevets⁷ : C12Q 1/14

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002788

(22) Date de dépôt international :
23 septembre 2003 (23.09.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/11718 23 septembre 2002 (23.09.2002) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : RAMBACH, Alain [FR/FR]; 73, boulevard
Montparnasse, F-75006 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : LE COUS-
TUMIER, Alain [FR/FR]; 750, chemin des Junies,
F-46000 Cahors (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 2004/027086 A1

(54) Title: METHOD OF DETECTING METICILLIN-RESISTANT MICRO-ORGANISMS

(54) Titre : PROCÉDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES RESISTANTS A LA METICILLINE

(57) Abstract: The invention relates to a novel solid medium for detecting meticillin-resistant micro-organisms, containing an antibi-
otic selected from the cephalosporin group, particularly second and third generation, and a chromogenic agent bearing a chromophore
which is released after hydrolysis with an active enzyme in said micro-organisms.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à un nouveau milieu solide de détection de microorganismes résistants à la méticilline, dans
lequel sont présents un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines notamment de seconde ou troisième génération, et un
agent chromogène portant un chromophore libéré après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

PROCEDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES RESISTANTS A LA METICILLINE

L'invention se rapporte à un nouveau milieu gélifié de détection de
5 microorganismes résistants à la méticilline, dans lequel sont présents un
antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines notamment de seconde ou
troisième génération, et un agent chromogène portant un chromophore libéré après
hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

La détection systématique des *Staphylococcus aureus* résistants à la
10 méticilline (aussi écrite méthicilline) (MRSA) est importante.

En effet, bien que les MRSA ne semblent pas plus virulents que les MSSA,
(Staphylocoques dorés sensibles à la méticilline), leurs infections sont plus difficiles
et onéreuses à traiter. Ceci est dû à ce que la méti-résistance confère la résistance à
toutes les bêta-lactamines et que cette résistance est très souvent associée à des
15 résistances à de nombreux autres antibiotiques antistaphylococciques majeurs (Lyon
et Skurry, Microbiol. Rev. 51 ; 88 – 134)

Pour cette détection on a parfois utilisé des milieux de croissance gélosés
supplémentés à la méticilline. Cette méthode est maintenant souvent abandonnée
car elle détecte mal certaines souches MRSA, en particulier des souches
20 hétérogènes dans lesquelles des populations bactériennes contiennent une
proportion très faible de bactéries franchement résistantes à la méticilline (dans
lesquelles 1 bactérie sur 10^4 ou 10^8 exprime la résistance). Cette méthode donne un
nombre important de résultats faux négatifs.

L'utilisation de milieux de croissance gélosés supplémentés à l'oxacilline est
25 fréquente mais, comme avec la méticilline, certaines souches sont difficiles à
détecter.

De plus, pour que ces antibiotiques (méticilline, oxacilline) fonctionnent à
peu près efficacement comme suppléments sélectifs, on est contraint de n'employer
que certains milieux de croissance. En conséquence les milieux proposés à
30 l'utilisateur sont par exemple des dérivés du Muller Hinton Agar ou du Mannitol
Salt Agar. Malheureusement pour l'utilisateur ces milieux sont souvent peu
discriminants pour l'espèce *S. aureus* ce qui diminue encore la sensibilité et la
spécificité.

On a proposé des milieux de croissance gélosés supplémentés à la tobramycine ou l'ofloxacine, soit dans des bases peu discriminantes (dérivées du Mannitol salt Agar par exemple), soit dans la base très discriminante du CHROMagar Staph aureus, mais la corrélation avec la résistance à la méticilline est médiocre d'où un excès de faux positifs et de faux négatifs.

On utilise aussi la méthode de diffusion sur gélose, par exemple la gélose Mueller Hinton, qui consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après incubation, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque qui permet de mesurer un diamètre, qui reflète la valeur de la CMI (concentration minimale d'inhibition, concentration minimale pour laquelle aucune croissance des microorganismes n'est détectée).

La présente invention se rapporte à un milieu de culture gélosé permettant de détecter les microorganismes résistants à la méticilline, et en particulier les staphylocoques, notamment les staphylocoques dorés, avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

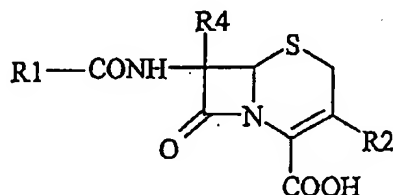
Ainsi, dans le cadre de la présente invention, on utilise les capacités discriminantes des milieux chromogènes, en combinaison avec les propriétés des antibiotiques de la famille des céphalosporines de 2^{ème} ou 3^{ème} génération, qui permettent de détecter les microorganismes résistants à la méticilline.

L'invention se rapporte donc à un milieu pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits microorganismes, au moins un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines de seconde ou troisième génération, et un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

Les milieux de culture selon l'invention permettent une détection directe des microorganismes résistants à la méticilline, en raison de leur croissance sur le milieu selon l'invention et de la présence de(s) l'agent(s) chromogène(s), permettant de définir la nature du microorganisme. On n'a donc pas besoin d'étape supplémentaire de confirmation de la nature des microorganismes poussant sur le milieu selon l'invention.

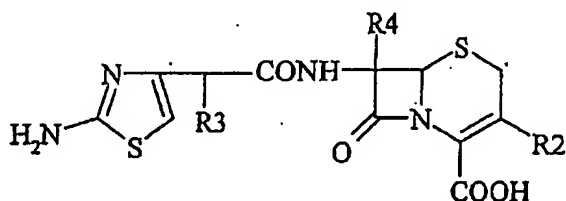
Les milieux selon l'invention permettent la détection de bactéries résistantes à la méticilline, à partir d'un inoculum strié sur boîte, alors que la majorité des méthodes de l'art antérieur utilisent un dépôt d'environ 10^4 à 10^5 bactéries sur la gélose. On peut utiliser les milieux selon l'invention directement à partir d'un
 5 prélèvement à partir d'un patient, ou après une phase d'enrichissement.

Par céphalosporine de seconde ou troisième génération, on entend désigner les antibiotiques de la famille des céphalosporines présentant une formule dérivée de la formule (I) suivante :



10 dans laquelle R2 est un groupement H, acétoxy-méthyle, méthyl-thiotétrazole, diméthyl-amino-éthyl-thiotétrazole, triazine, acétamino-pyridine (pyridinium), ou pyridinium substitué par un groupement carbamoyl, cyclo-pento-pyridinium, thiométhyl-acétoxy-thiazole, R1 est un hétérocycle amino-2-thiazole, une α -pipérazine-dione, un α -sulfo-phényle, et R4 est un groupement H ou un radical α -
 15 méthoxy.

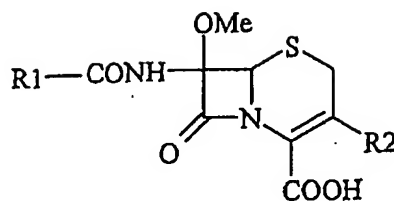
En particulier, on entend désigner les composés présentant la formule suivante :



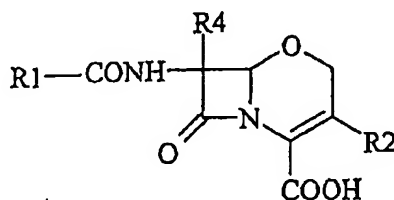
dans laquelle R3 est un groupement H ou un groupement α -méthoxy-imino.

20 Dans un cas particulier, le groupement R4 est un hydrogène.

Les céphamycines sont des composés dans lesquels le groupement R4 est un radical α -méthoxy, protégeant le noyau β -lactame de l'hydrolyse par les β -lactamases et répondent à la formule suivante :



Les oxacephems sont des composés dans lesquels l'atome soufre du noyau céphem est remplacé par un atome d'oxygène, et sont considérés comme dérivés de la formule (I) présentée plus haut.



5

En général, pour ces composés, le groupement R4 est un α -méthoxy.

Une définition des céphalosporines ainsi envisagées peut être trouvée dans Binger (Mécanisme d'Action des Bêta-lactamines, (de la structure bactérienne à la structure de la molécule), 1986 Roussel (Paris) éditeur, chapitre III pages 47-62, et
 10 chapitre IV pages 63-68), et dans l'ouvrage de Richmond (Beta-lactam antibiotics (the background to their use as therapeutic agents), Hoechst Aktiengesellschaft, D-6230 Frankfurt (Main) 80 éditeur, 1981, chapitre 3 pages 55-65).

A titre accessoire, on peut noter que les céphalosporines de seconde
 15 génération présentent un meilleur effet que les céphalosporines de première génération contre les bactéries Gram négatives et résistent mieux à la dégradation par les β -lactamases, les céphalosporines de troisième génération présentant un spectre d'effet encore plus large vis-à-vis des bactéries Gram négatives.

Parmi les céphalosporines de seconde et troisième génération, on peut citer :
 20 loracarbef, cefaclor, cefuroxime, cefprozil, cefoxitin (cefoxitan), cefamandole, cefotian, cefotetan, cefmetazole, cefocinide, ceforanide, cefpodoxime, cefixime, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefmenoxime, cefodizime, cefoperazone, cefepime, cefpirome, cefsulfonide, cefetamete, ceftibutene, moxalactam, latamoxef et flomoxef, notamment sous forme de sels (sodiques).
 L'homme du métier peut obtenir des listes de tels composés, notamment sur
 25 Internet au site www.biam2.org ou www.fpnotebook.com.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefamandole.

Dans un autre mode de réalisation, ledit antibiotique est choisi dans le groupe des céphamicines (cefoxitine, cefotetan, cefmetazole, cefbupérazone, cefminox) et des oxacephems (moxalactam, latamoxef ou flomoxef).

5 Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est la cefoxitine.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefmetazole.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le moxalactam.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefotetan.

10 La concentration en antibiotique dans le milieu selon l'invention est de préférence comprise entre 0,5 et 50 mg/l, de préférence 1,5 et 30 mg/l, en particulier 1,5 et 15 mg/l. Quelques essais de routine permettent à l'homme du métier de l'ajuster en fonction de la CMI (concentration minimale d'inhibition, concentration minimale pour laquelle aucune croissance des microorganismes n'est détectée) des microorganismes considérés pour l'antibiotique considéré.

15 Il est à noter que parmi les antibiotiques susceptibles d'entrer dans la composition d'un milieu de l'invention, certains sont capables de conférer certaines propriétés audit milieu. Par exemple, la cefoxitine ou le cefmetazole confèrent une stabilité particulière, d'au moins 2 mois audit milieu.

20 Par exemple, on a observé une stabilité d'au moins 2 mois pour un milieu conforme à l'invention préparé avec de la cefoxitine à une concentration de 5 mg/l, ajoutée au milieu quand celui-ci est à une température de 48°C. La stabilité du milieu conforme à l'invention a été portée à au moins 5 mois quand celui-ci a été préparé avec du cefmetazole à une concentration de 2,5 mg/l, ajouté au milieu lorsque celui-ci est à une température de 48°C.

25 Par « stabilité du milieu », on entend désigner la capacité du milieu conforme à l'invention à permettre la détection sélective de microorganismes résistants à la méticilline, en particulier des staphylocoques dorés, pendant un temps donné, avec la même fiabilité pendant toute la durée de la période.

30 Il est également à noter qu'une autre céphalosporine, le flomoxef, présente quant à lui la capacité à conserver son activité antibiotique lorsqu'il est soumis à une température supérieure à 100°C (sa résistance ayant même été vérifiée par les inventeurs à 121°C).

Une telle propriété permet de réaliser un milieu conforme à l'invention sous forme d'une unique poudre, ce qui limite considérablement les manipulations nécessaires à effectuer dans des conditions stériles pour la préparation de tout milieu de culture. Le flomoxef peut donc être incorporé au milieu en préparation
5 avant chauffage ce qui en facilite la préparation. Cet avantage n'est pas négligeable car est de nature à faciliter la tâche de toute personne ayant à préparer de tels milieux, quelle que soit son expérience en la matière.

Dans un mode de réalisation préféré, lesdits microorganismes sont des staphylocoques, et on utilise préférentiellement un agent chromogène choisi dans le
10 groupe constitué du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, ainsi que décrit dans la demande WO 00/53799.

Les milieux de culture de *S. aureus* sont connus et décrits notamment dans le manuel "Oxoid Unipath Limited", Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, Angleterre. Il peut s'agir, par exemple de "Nutrient Agar Oxoid CM3",
15 milieu essentiellement à base d'extraits de levure, de peptone et d'agar.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit milieu de culture contient à la fois du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.

Les milieux selon la présente invention contiendront, de préférence, de 0,01
20 à 0,50 g/l, notamment de 0,05 à 0,40 g/l de 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

Dans un mode de réalisation particulier, le milieu de culture selon
25 l'invention comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

Dans un mode de réalisation particulier, ledit milieu contient en outre de la déféroxamine. La déféroxamine permet en effet d'inhiber *Staphylococcus epidermis*
30 sans inhiber *Staphylococcus aureus*, la concentration mise en oeuvre sera de préférence comprise entre 0,01 et 0,10 g/l.

Dans un mode de réalisation, le milieu selon l'invention contient également un antibiotique glycopeptide choisi dans le groupe constitué de la vancomycine, la

teicoplanine et l'avoparcine et leurs mélanges, afin de détecter les microorganismes résistants à la fois à la méticilline et à la vancomycine. On peut utiliser environ de 5 mg/l à 50 mg/l de ces antibiotiques, plus particulièrement de 5 mg/l à 30 mg/l, de 10 mg/l à 30 mg/l, environ 25 mg/l.

- 5 Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont montré qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une forte charge osmotique dans le milieu de culture. Ainsi, contrairement aux milieux de détection de staphylocoques dorés résistants à la méticilline, utilisant l'oxacilline comme antibiotique, dans lesquels on ajoute du chlorure de sodium, le milieu de culture de l'invention est également fonctionnel
- 10 avec une concentration de sodium inférieure à 3 %, et égale à environ 2-2,5 %. Les conditions d'incubation peuvent être adaptées en fonction de la quantité de chlorure de sodium dans le milieu (durée d'incubation, température plus ou moins élevée...).

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'un milieu selon l'invention pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline.

- 15 L'invention se rapporte également à un procédé de détection de microorganismes résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

- inoculer un milieu selon l'invention avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
- 20 - incuber ledit milieu dans des conditions permettant la croissance desdits microorganismes,
- détecter, sur ledit milieu, la présence desdits microorganismes résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.

- 25 Les conditions d'incubation sont connues de l'homme du métier, et on utilise généralement une incubation à des températures comprises entre 25°C et 42°C, de préférence entre 30°C et 38°C.

Les durées d'incubation sont classiques (environ 24 heures).

Selon le microorganisme considéré, on peut utiliser une durée d'incubation plus courte ou plus longue, travailler dans des conditions aérobies ou anaérobies...

- 30 Le milieu selon l'invention permet notamment de détecter aisément les staphylocoques résistants à la méticilline, en réduisant le temps d'analyse. La combinaison des antibiotiques choisis dans le cadre de l'invention et des agents

chromogènes permet en effet de réduire le nombre de faux positifs et de faux négatifs, et de diminuer ainsi le besoin de réaliser des analyses complémentaires.

EXEMPLES

5 Exemple 1

Composition d'un milieu selon l'invention pour la détection de *S. aureus* résistants à la méticilline :

- Peptone et extrait de levure 40 g/l
- NaCl 25 g/l
- 10 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate 0,10 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside 0,05 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside 0,05 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide 0,05 g/l
- Déféroxamine 0,050 g/l
- 15 Agar 15 g/l

On ajoute, dans ce milieu, de l'oxacilline (6 mg/ml) ou de la cefoxitine (5 mg/l), après autoclavage, avant que le milieu ne soit solide (lorsqu'il est à une température d'environ 45 °C).

- 20 Ce milieu contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, permettant la détection spécifique des staphylocoques dorés (coloration mauve des colonies), ainsi que du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide, pour colorer les autres microorganismes pouvant être présents dans l'inoculum.

25 Exemple 2

Etude de la croissance de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline sur le milieu CHROMagar Staph aureus (disponible par la société CHROMagar, 4, Place du 18 Juin 1940, 75006 Paris France) :

- AR4295 MetiS : souche sensible à la méticilline
- 30 AR4297 MetiR : souche résistante à la méticilline (homogène)
- MRhet : souche résistante à la méticilline (hétérogène)
- Z252 : souche résistante à la méticilline, homogène, faible niveau de résistance

	AR4295 MetiS	AR4297 MetiR	MRhet	Z252
CHROMagar Staph aureus	+	+	+	+
CHROMagar Staph aureus + oxacilline 6 mg/ml	-	+/-*	-	-
CHROMagar Staph aureus + Cefoxitine 5 mg/l	-	+	+	+

+ = croissance de colonies ; - = pas de croissance ; * = microcolonies

On inocule les boîtes de Pétri avec des cultures bactériennes en striant les boîtes, pour observer la croissance de bactéries isolées, après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les bactéries qui croissent donnent des colonies mauves sur le milieu de culture, confirmant que les microorganismes sont des staphylocoques dorés.

Ainsi, le milieu selon l'invention permet de détecter directement les staphylocoques dorés résistants à la méticilline, y compris les souches hétérogènes ou à faible niveau de résistance, du fait de la combinaison de la croissance des bactéries et de la coloration des colonies.

REVENDICATIONS

1. Milieu pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits microorganismes, un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines de seconde ou de troisième génération, et un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.
2. Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits microorganismes sont des staphylocoques, en particulier des staphylocoques dorés.
3. Milieu selon la revendication 2, dans lequel ledit agent chromogène est choisi dans le groupe constitué du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.
4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit antibiotique est le cefamandole.
5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit antibiotique est choisi dans le groupe des céphamicines et des oxacephems.
6. Milieu selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit antibiotique est choisi dans le groupe constitué de la cefoxitine, le cefmetazole, le moxalactam, le cefotetan et le flomoxef.
7. Milieu selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce qu'il contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.
8. Milieu selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.
9. Milieu selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisé en ce qu'il contient, en outre, un antibiotique choisi dans le groupe constitué de la vancomycine, la teicoplanine, l'avoparcine, et leurs mélanges.
10. Milieu selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisé en ce que la concentration en chlorure de sodium est inférieure à 3 %.

11. Milieu selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la concentration en antibiotique est comprise entre 0,5 et 50 mg/l.
12. Milieu selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la concentration d'un agent chromogène est comprise entre 0,01 et 0,5 g/l.
- 5 13. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 12 pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline.
14. Procédé de détection de microorganismes résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :
- inoculer un milieu selon l'une des revendications 1 à 12
10 avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
 - incuber ledit milieu dans des conditions permettant la croissance desdits microorganismes,
 - détecter, sur ledit milieu, la présence desdits
15 microorganismes résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern
Publication No
PCT/FR 03/02788

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>AYERS L W ET AL: "CEFOTETAN A NEW CEPHAMYCIN COMPARISON OF IN-VITRO ANTI MICROBIAL ACTIVITY WITH OTHER CEPHEMS BETA LACTAMASE STABILITY AND PRELIMINARY RECOMMENDATIONS FOR DISC DIFFUSION TESTING"</p> <p>ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 22, no. 5, 1982, pages 859-877, XP008017736</p> <p>ISSN: 0066-4804</p> <p>the whole document</p> <p>abstract</p> <p>table 2</p> <p>table 7</p> <p>page 862, right-hand column, line 11 -page 863, right-hand column, line 10</p> <p>-/-</p>	1,2,4-6, 10-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 2004

Date of mailing of the international search report

11/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tuynman, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent No.
PCT/FR 03/02788

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>JONES R N ET AL: "IN-VITRO ANTI MICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF CEFODIZIME HR-221 A NEW SEMI SYNTHETIC CEPHALOSPORIN" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 20, no. 6, 1981, pages 760-768, XP008017735 ISSN: 0066-4804 the whole document page 761, left-hand column, line 32 -right-hand column, line 45 tables 2,4</p>	1,2,4, 10-12
Y	<p>KLUYTMANS JAN ET AL: "Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying Staphylococcus aureus and detecting methicillin resistance." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. UNITED STATES JUL 2002, vol. 40, no. 7, July 2002 (2002-07), pages 2480-2482, XP001157563 ISSN: 0095-1137 the whole document</p>	1-14
Y	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199511 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-077141 XP002243919 & JP 07 000181 A (KYOKUTO SEIYAKU KOGYO KK), 6 January 1995 (1995-01-06) abstract</p>	1-14
A	<p>MERLINO JOHN ET AL: "New chromogenic identification and detection of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 2378-2380, XP001157564 ISSN: 0095-1137 the whole document</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern:

Application No

PCT/FR 03/02788

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
JP 7000181	A	06-01-1995	JP	3298932 B2	08-07-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Indice nationale No
PCT/FR 03/02788

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>AYERS L W ET AL: "CEFOTETAN A NEW CEPHAMYCIN COMPARISON OF IN-VITRO ANTI MICROBIAL ACTIVITY WITH OTHER CEPHEMS BETA LACTAMASE STABILITY AND PRELIMINARY RECOMMENDATIONS FOR DISC DIFFUSION TESTING"</p> <p>ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 22, no. 5, 1982, pages 859-877, XP008017736</p> <p>ISSN: 0066-4804</p> <p>le document en entier</p> <p>abrégé</p> <p>tableau 2</p> <p>tableau 7</p> <p>page 862, colonne de droite, ligne 11</p> <p>-page 863, colonne de droite, ligne 10</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	<p>1,2,4-6, 10-12</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 mars 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/03/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Tuynman, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/02788

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>JONES R N ET AL: "IN-VITRO ANTI MICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF CEFODIZIME HR-221 A.. NEW SEMI SYNTHETIC CEPHALOSPORIN" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 20, no. 6, 1981, pages 760-768, XP008017735 ISSN: 0066-4804 le document en entier page 761, colonne de gauche, ligne 32 -colonne de droite, ligne 45 tableaux 2,4</p>	1,2,4, 10-12
Y	<p>KLUYTMANS JAN ET AL: "Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying Staphylococcus aureus and detecting methicillin resistance." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. UNITED STATES JUL 2002, vol. 40, no. 7, juillet 2002 (2002-07), pages 2480-2482, XP001157563 ISSN: 0095-1137 le document en entier</p>	1-14
Y	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199511 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-077141 XP002243919 & JP 07 000181 A (KYOKUTO SEIYAKU KOGYO KK), 6 janvier 1995 (1995-01-06) abrégé</p>	1-14
A	<p>MERLINO JOHN ET AL: "New chromogenic identification and detection of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 6, juin 2000 (2000-06), pages 2378-2380, XP001157564 ISSN: 0095-1137 le document en entier</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de internationale No
PCT/FR 03/02788

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 7000181 A	06-01-1995	JP 3298932 B2	08-07-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.